



TITLE:

# Studies on nucleotide and pentose metabolism in Archaea( Abstract\_要旨)

AUTHOR(S):

Aono, Riku

---

CITATION:

Aono, Riku. Studies on nucleotide and pentose metabolism in Archaea.  
京都大学, 2015, 博士(工学)

ISSUE DATE:

2015-05-25

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k19188>

RIGHT:

学位規則第9条第2項により要約公開; 許諾条件により要約は2016-05-01に公開; 許諾条件により要旨は2015-08-01に公開

京都大学	博士（工学）	氏名	青 野 陸
論文題目	Studies on nucleotide and pentose metabolism in Archaea (アーキアにおける核酸およびペントース代謝に関する研究)		
<p>（論文内容の要旨）</p> <p>本論文は、アーキアにおける核酸およびペントース代謝に着目し、関連する酵素の生化学的・遺伝学的な解析を通じたその代謝ネットワークの解明をまとめたものであり、序論、本編 4 章および結論から構成されている。</p> <p>序論では、アーキアの分類、超好熱性アーキア <i>Thermococcus kodakarensis</i> の性質および遺伝子組換え技術、アーキア特有の代謝経路について、そして本論文の意義等がまとめられている。</p> <p>第一章では、アーキア特有の AMP を分解する経路を構成する 2 種類の新規酵素 AMP phosphorylase (AMPpase) および ribose-1,5-bisphosphate (R15P) isomerase の反応機構および多量体形成機構に関する研究について述べている。アーキア特有の AMP を分解する経路は AMPpase, R15P isomerase および Type III ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco)により構成されている。この経路ではまず AMPpase による AMP の加リン酸分解により R15P を生成し、R15P isomerase による異性化により ribulose 1,5-bisphosphate (RuBP) を生成、そして Rubisco により中央糖代謝の中間生成物である 3-phosphoglycerate (3-PGA) を生成する。AMPpase および R15P isomerase はこれまで知られていなかった反応を触媒するため、それらの解析を進めることで新たな物質変換機構および多量体形成機構の発見が期待された。本学理学研究科三木邦夫研究室による結晶構造のデータを基に R15P isomerase および AMPpase の変異型タンパク質の作製・解析を進め、R15P isomerase の Cys133 および Asp202 が酵素活性に不可欠であり、Arg227 が多量体形成に重要であることが明らかにされた。一方 AMPpase については、N 末ドメインが多量体形成および酵素活性に重要であり、C 末残基も多量体形成に重要であることが明らかにされた。そして AMPpase の Asp256 および Lys288 が酵素活性に不可欠であることも明らかにされた。以上のように、本章では新規酵素 AMPpase および R15P isomerase の活性および多量体形成に重要な残基が同定され、反応および多量体形成機構に関する新たな知見について述べられている。</p> <p>第二章では、AMPpase および R15P isomerase の酵素学的解析について述べられている。本研究の結果、R15P isomerase がアーキア特有の AMP 分解経路の基質である AMP により活性化されることが明らかとなった。一方 AMPpase は AMP についてのみ活性を示すと考えられていたのに対し、活性測定系を最適化して基質特異性の再検討を行ったところ、CMP および UMP に対しても活性を示すことが明らかにされた。また AMPpase, R15P isomerase および Rubisco について、転写・翻訳レベルでの制御について検討を行っている。<i>T. kodakarensis</i> について nucleoside を添加した培地で培養したところ、AMPpase については大きな変化は見られなかったものの、R15P isomerase および Rubisco の細胞内タンパク質量が増加することが明らかにされ、これらの酵素が nucleoside の代謝に関与する可能性が示唆されている。以上のように、本章では新規酵素 AMPpase および R15P isomerase に関する酵素学的な諸性質を明らかにするとともに、アーキア特有の nucleoside monophosphate (NMP) 分解経路が nucleoside の代謝に関わる可能性も示唆されている。</p>			

京都大学	博士（工学）	氏名	青 野 陸
<p>第三章では、<i>T. kodakarensis</i> における nucleoside 分解機構に着目し、nucleoside kinase の探索を行っている。細菌・真核生物において nucleoside はペントースリン酸経路を介して分解される。一方 <i>T. kodakarensis</i> を含む多くのアーキアはペントースリン酸経路を持たないことから、アーキアにおいて nucleoside がどのように分解されるのかが不明であった。ところが第二章において、アーキア特有の NMP 分解経路が nucleoside の代謝に関わる可能性が示唆された。NMP 分解経路が nucleoside の代謝に関わるならば、nucleoside をリン酸化して NMP を生成する nucleoside kinase が存在すると予想された。しかしながら <i>T. kodakarensis</i> には nucleoside kinase と推定される遺伝子が存在しなかったため、本章では未同定の nucleoside kinase が存在する可能性を考え、その探索が進められた。アーキアにおいてこれまで nucleoside kinase 活性を示す酵素が 3 種報告されている。<i>T. kodakarensis</i> のゲノム上について、これらと相同性を示す遺伝子を探索したところ、TK1843 および TK2029 が最も高い相同性を示すことが明らかにされた。これらの遺伝子について基質特異性を検討したところ、TK1843 が cytidine kinase 活性を示し、cytidine から CMP を生成することが明らかにされた。一方 TK2029 は nucleoside kinase 活性を示さなかったものの、ADP-dependent ribose-1-phosphate (R1P) kinase 活性を示し、ADP をリン酸基供与体とし、nucleoside の加リン酸分解産物である R1P を R15P へと変換することが明らかにされた。以上のように、本章ではアーキア特有の NMP 分解経路の基質または中間産物を生成する新規酵素が同定されている。また、TK1843 および TK2029 について詳細な酵素学的解析も行われている。</p> <p>第四章では、遺伝学的手法を用いて nucleoside 分解機構の解析を進めている。細菌・真核生物において R1P は nucleoside phosphorylase による nucleoside の加リン酸分解により生成する。<i>T. kodakarensis</i> のゲノム上には 1 つの uridine phosphorylase (TK1479) および 2 つの purine nucleoside phosphorylase (TK1482, TK1895) をコードする遺伝子が存在する。そこでこれら 3 種の nucleoside phosphorylase および TK1843, TK2029, AMPpase の遺伝子破壊株を作製し、その細胞抽出液において nucleoside から R15P が生成するかが検証された。その結果、adenosine は TK1895, guanosine は TK1482, uridine は TK1479 により R1P へ変換され、TK2029 により R15P へと変換されることが示されている。一方 TK1843 の関与は不明であるが、cytidine は CMP へ変換され、AMPpase により R15P へと変換されることが示唆された。以上のように、<i>T. kodakarensis</i> における nucleoside 分解経路の全容が明らかにされた。ペントースリン酸経路ではモノリン酸化合物を介して代謝が進むのに対し、今回発見された経路ではビスリン酸化合物を介して代謝が進むことからペントースビスリン酸経路と名付けられた。</p> <p>結論では、本論文で得られた成果について要約している。</p>			

## (論文審査の結果の要旨)

本論文は、超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* を用い、アーキアにおける核酸およびペントース代謝の解明を目標とした研究であり、得られた主な成果は次のとおりである。

1. アーキア特有の AMP 代謝経路を構成する ribose-1,5-bisphosphate (R15P) isomerase および AMP phosphorylase (AMPpase) の反応機構および多量体形成機構を提唱した。
2. R15P isomerase が AMP により活性化されることを明らかにし、AMPpase が AMP のみならず CMP および UMP も基質とすることを明らかにした。またアーキア特有の AMP 代謝経路を構成する R15P isomerase および ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) が nucleoside により転写・翻訳レベルで活性化されることを明らかにした。
3. *T. kodakarensis* に存在する TK1843 が cytidine kinase、TK2029 が ADP-dependent ribose-1-phosphate kinase 活性を示し、アーキア特有の AMP 代謝経路の基質または中間産物を生成することを明らかにした。
4. *T. kodakarensis* における nucleoside の物質変換を遺伝学的手法により明らかにし、アーキアにおいてこれまで知られていなかった nucleoside 分解機構の全容を明らかにした。

以上のように、本論文は微生物の代謝機構における基盤的知見を著しく向上させたものであり、学術上、實際上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士(工学)の学位論文として価値あるものと認める。また、平成27年4月21日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行って、申請者が博士後期課程学位取得基準を満たしていることを確認し、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

要旨公開可能日： 平成27年 8月 1日以降